



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103063770 A

(43) 申请公布日 2013. 04. 24

(21) 申请号 201210570745. 2

(22) 申请日 2012. 12. 26

(71) 申请人 西北农林科技大学

地址 712100 陕西省西安市杨凌示范区邠城
路 3 号

(72) 发明人 张强 苏印泉 朱铭强 张京芳
郑冀鲁

(51) Int. Cl.

G01N 30/02 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种检测动植物油脂中抗氧化物质的方法

(57) 摘要

本发明是一种检测动植物油脂中的抗氧化物质的装置及其操作方法,属于高效液相色谱分析技术领域。此发明可以快速检测油脂中具有抗氧化活性的物质。装置由一台高效液相色谱仪(HPLC,包括高压泵、硅胶液相色谱柱、可见紫外检测器、进样器、信号记录仪)和一台高压泵、一台可见检测器、一个信号记录仪、一个HPLC用“三通”、一个缓冲器和一个反应圈组成,采用化学自由基 Galvinoxyl 测定混合物中抗氧化物质。HPLC 流动相采用正己烷与叔丁基甲醚,自由基溶剂为正己烷。油脂中各组分经高效液相色谱分离后逐一与自由基反应,有抗氧化活性的组分使自由基褪色,成为负峰,对比色谱图和与自由基反应后的色谱图,可以得到油脂中抗氧化物质的数目,各组分保留时间和抗氧化活性强弱。此方法快速简便,灵敏度高。

1. 一种检测动植物油脂中抗氧化物质的方法,是利用高效液相色谱检测动植物油脂中抗氧化物质以及抗氧化剂的分析方法,其装置由一台高效液相色谱仪(包括进样器、高压泵、硅胶液相色谱柱、可见紫外检测器、信号记录仪)和一台高压泵、一个缓冲器、一台可见紫外检测器、一个信号记录器、“三通”和一个反应圈组成。

2. 如权利要求(1)所述,自由基选用 Galvinoxyl 自由基(CAS:2370-18-5)。

3. 如权利要求(1)所述,自由基浓度为 0.002mmol/L,溶剂为正己烷,自由基溶液流速为 0.8-1.5mL/min。

4. 如权利要求(1)所述,自由基检测波长为 425nm。

5. 如权利要求(1)所述,高效液相色谱洗脱剂为正己烷和叔丁基甲醚,叔丁基甲醚含量最高可达到 100%,洗脱剂流速为 0.8-1.2mL/min。

一种检测动植物油脂中抗氧化物质的方法

一、技术领域：

[0001] 本发明属于高效液相色谱分析技术领域，更详细的说，是一种利用高效液相色谱和自由基检测系统在线检测动植物油脂中抗氧化物质的方法。

二、背景技术：

[0002] 高效液相色谱 (HPLC) 是一种高效分离分析混合物中化合物的仪器和方法，配备不同的检测器，可以检测混合物中不同性质的化合物。常用的检测器有：紫外吸收检测器 (UVD)、二极管阵列检测器 (DAD)、荧光检测器 (FLD)、示差折光检测器 (RID)、蒸发光散射检测器 (ELSD)、质谱检测器 (MSD)。这些检测器均以化合物的某种化学物理性质检测化合物，与化合物活性没有紧密联系。

[0003] 动植物油脂中由于含有不饱和脂肪酸，极易氧化酸败。含油脂食品在储运加工中易发生氧化，油脂氧化所产生的产物会对含油脂食品的风味、色泽以及组织产生不良的影响，以至于缩短货架期，降低这类食品的营养品质，危害人类身体健康。添加抗氧化剂是保护油脂和含油脂食物以延长保质期的的重要手段。食品中抗氧化剂的检测，是食品安全研究与技术领域不可或缺的部分。应用现有的检测方法检测油脂中抗氧化物质，要求知道抗氧化物质的结构和性质等，才能确定检测方法参数，无法做到对未列入检测项目的抗氧化物质的检测。而且一般需要利用极性溶剂萃取后，才能进行 HPLC 分析，操作比较繁琐。

[0004] 鉴于以上种种情况，一种将高效液相色谱和自由基检测系统联用以快速检测混合物中抗氧化活性化合物和抗氧化剂的方法逐步发展起来。该方法相当于在高效液相色谱已有的可见紫外检测器的基础上再加上抗氧化活性检测器，这样一次色谱分析即可得到混合物中各个化合物的抗氧化活性数据，检测出已知的和未知的抗氧化物质。

[0005] 这类方法在国内仅有 8 篇文章发表，专利申请 1 项。朱卉等选取 H_2O_2 及 $O_2^{\cdot-}$ 为检测自由基，检测了一种药品中抗氧化活性化合物。吴雷等以 $O_2^{\cdot-}$ 为检测自由基，检测了中药材麦冬中的抗氧化活性化合物。 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 不稳定，系统需要用鲁米诺和连苯三酚或者过氧化氢，因此体系反应复杂，稳定性和灵敏度不理想。王小淞等选取 DPPH 自由基为检测用自由基，检测了黄芩根提取物中的抗氧化活性成分。张雷等、傅茂润等也以相似的方法检测了茶叶、紫薯中的抗氧化物质。DPPH 自由基稳定，系统组成与使用 ABTS 自由基类似，但灵敏度不及 ABTS 自由基。裴世春等、高翔等、耿雪飞等利用 ABTS 自由基联用 HPLC 检测植物材料中抗氧化物质。西北农林科技大学申请了利用 ABTS 自由基检测混合物中抗氧化活性物质的发明专利（申请号 201110330342.6）。但是以上所有方法均使用反相 HPLC 色谱柱和水、甲醇、乙腈等极性洗脱剂，对动植物油脂等弱极性材料分离效果欠佳，因此未用于检测动植物油脂中的抗氧化物质。

三、发明内容：

[0006] 本发明的目的在于提供一种以高效液相色谱和自由基检测系统联用的装置和方法，检测动植物油脂中的抗氧化物质，为动植物油脂中抗氧化物质（包括已知的和未知的）

的检测提供一种灵敏度高,重复性好,操作简便,检测快速的方法。

[0007] 为实现上述目的,本发明采用的技术方案为:

[0008] 一种检测动植物油脂中抗氧化物质的方法,是利用高效液相色谱和自由基检测系统分析油脂中抗氧化物质的分析方法,包括以下装置,参数设置和分析方法:

[0009] (1) 装置:所需仪器有一套高效液相色谱仪 HPLC(包括高压泵;进样器;可见紫外检测器;记录仪,配以硅胶液相色谱柱),一台可见检测器,一个缓冲器,一台信号记录仪,一台高压泵,一个 HPLC 用“三通”和 HPLC 用塑料(PEEK)管道。

[0010] HPLC 的可见紫外检测器连接到一个 HPLC 用“三通”,“三通”另一路经缓冲器连接至输送自由基溶液的高压泵,第三路经由反应圈(HPLC 用连接管道,材料为 PEEK,内径小于等于 0.25mm,长度为 10.0-30.0m)连接至可见吸收检测器和一个信号记录器。

[0011] (2) 参数设置:

[0012] ①自由基选用 Galvinoxyl 自由基(CAS:2370-18-5),浓度为 0.002mmol/L,溶剂为正己烷,流速 0.8-1.5mL/min,可见检测器检测波长为 425nm。

[0013] ②高效液相色谱参数设定。洗脱剂流速 0.8-1.2mL/min。洗脱剂为正己烷和叔丁基甲醚,叔丁基甲醚含量最高可达到 100%。检测器波长依检测对象和目的设置。

[0014] (3) 分析方法:

[0015] ①开启系统中所有仪器。按照(2)设定参数。②准确称取待测动植物油脂 1.000g,溶于 100mL 正己烷中,以孔径 0.45 μm 过滤膜过滤,准确进样 10-20 μL 分析。③仪器分析完成后,将两台可见紫外检测器所得图谱对照,如果两张图有色谱峰保留时间一致,可确定此色谱峰代表的化合物为抗氧化物质。HPLC 的检测器出现的色谱峰,如果无保留时间一致的自由基检测峰可确定为无抗氧化物质。

[0016] 与现有技术相比,本发明具有的优点和效果如下:

[0017] (1) 本发明在系统中采用 Galvinoxyl 自由基作为抗氧化物质检测自由基,此自由基为市售商品,质量稳定,来源广泛,使用方便。此自由基比 H₂O₂ 及 O₂[·]稳定,比 ABTS 自由基和 DPPH 自由基更易于溶解于弱极性溶剂,在弱极性溶剂中与抗氧化物质反应灵敏度更高。

[0018] (2) 本发明采用硅胶色谱柱为分离柱,比采用反相色谱柱的同类方法更适于检测动植物油脂等弱极性混合物。

[0019] (3) 本发明所建立方法可以发现动植物油脂中未列入检测项目的未知抗氧化物质。

[0020] (4) 样品无需进行萃取等前处理,样品直接溶于溶剂,过滤后即可进样分析,操作简单省时。

四、附图说明:

[0021] 附图为本发明的装置图。图中上部所示 HPLC 高压泵、硅胶色谱柱、紫外检测器和记录仪等是一套 HPLC 仪器。样品进样后,经色谱柱分离,经紫外检测器得到上部的色谱图,再流向“三通”,与高压泵经缓冲器输送来的自由基溶液混合,在反应圈中反应,再经过检测器得到下部只有“负峰”出现的色谱图。由下部色谱图可知油脂中抗氧化物质种类数目与各自活性大小,对比上部色谱图可知对应抗氧化物质的保留时间。

五、具体实施方式：

[0022] 为了进一步说明本发明，下面举三个实施例。

[0023] 实施例一：检测玉米胚芽油中抗氧化物质

[0024] 1 装置

[0025] 装置如附图 1 连接。HPLC 系统为 HP1050。包括 HPLC 高压泵，自动进样器，DAD 检测器，配以 AlltimaHPLC 硅胶色谱柱 ($3\ \mu\text{m}$, $150\times 4.6\text{mm i.d.}$)。数据处理用 HP 化学工作站。利用紫外可见吸收检测器 (Applied Biosystems, model 785A, Forster City, 美国) 连接一个记录器 (Kipp & Zonen BD40 ;Delft, 荷兰) 记录自由基溶液吸光度变化。测定 galvinoxyl[·] 检测波长为 425nm。利用一台 HPLC 泵 (Gynkotek, 300) 连接一个缓冲器 (superloop. GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, 瑞典, 150ml) 经“三通”输送自由基溶液至反应圈。反应圈材料为 PEEK, 型号为 $10.0\text{m}\times 0.25\text{mm i.d.}$ 。

[0026] 2 样品与溶剂处理

[0027] 玉米胚芽油 1.000g 溶于 100mL 正己烷中配制为 10mg/mL 溶液。所有需要 HPLC 分析的样品及溶剂均经 $0.45\ \mu\text{m}$ 过滤膜过滤处理。

[0028] 3 自由基溶液配制方法

[0029] 称取 Galvinoxyl 自由基 0.842g, 溶于 100mL 正己烷中, 此溶液用正己烷经过两次稀释, 每次稀释 100 倍, 配置为 0.002mmol/L 自由基溶液。

[0030] 4HPLC 分析方法

[0031] 流动相 A :正己烷 ;流动相 B :叔丁基甲醚。样品浓度 10mg/mL, 进样量 $10\ \mu\text{L}$ 。流速 1.0mL/min, 检测波长 280nm。梯度洗脱程序为 0-15min, B :8% -12% ;15-20min, B :12% -20% ;20-30min, B :20% -50% ;30-32min, B :50% -8% ;32-45min, B :0%。

[0032] 4 在线系统参数设定

[0033] HPLC 流速 1.0mL/min, 检测波长 280nm。自由基检测波长 425nm。自由基浓度 0.002mmol/L, 自由基溶液流速 1.0mL/min, 反应圈长度 10.0m。

[0034] 5 检测结果

[0035] 对比试验得到的两张色谱图色谱峰与负峰保留时间可知, 玉米胚芽油含有 3 种抗氧化物质。经过与合成抗氧化剂及维生素保留时间对比, 分析出样品玉米胚芽油中 3 种抗氧化物质为生育酚 α , 生育酚 B 和生育酚 γ , 其保留时间分别为 8.22min, 9.45min, 10.61min。

[0036] 实施例二：检测橄榄油中抗氧化物质

[0037] 1 装置 :同实施例一。

[0038] 2 样品与溶剂处理 :取橄榄油 1.0g 溶于 100mL 正己烷中配制为 10mg/mL 溶液。所有需要 HPLC 分析的样品及溶剂均经 $0.45\ \mu\text{m}$ 过滤膜过滤处理。

[0039] 3 自由基溶液配制 :同实施例一。

[0040] 4HPLC 分析方法

[0041] 洗脱剂 A :正己烷 ;洗脱剂 B :叔丁基甲醚, 流速 0.8mL/min。样品浓度 10mg/mL, 进样量 $20\ \mu\text{L}$ 。检测波长 292nm。梯度洗脱程序为 0-15min, B :8% -12% ;15-20min, B :12% -20% ;20-30min, B :20% -50% ;30-32min, B :50% -8% ;32-45min, B :0%。

[0042] 4 在线系统参数设定

[0043] HPLC 流速 0.8mL/min, 检测波长 292nm。自由基检测波长 425nm。自由基浓度 0.002mmol/L, 自由基溶液流速 1.0mL/min, 反应圈长度 10.0m。

[0044] 5 检测结果

[0045] 对比试验得到的两张色谱图色谱峰与负峰保留时间可知, 橄榄油含有 4 种抗氧化物质。经过与合成抗氧化剂及维生素保留时间对比, 分析出样品橄榄油中 4 种抗氧化物质为生育酚 α , 生育酚 δ 、生育酚 β 和生育酚 γ , 其保留时间依次分别为 8.24min, 8.87min, 9.51min, 10.54min。

[0046] 实施例三: 检测牛油中抗氧化物质

[0047] 1 装置: 同实施例一, 反应圈改为 30.0m 长。

[0048] 2 样品与溶剂处理: 取牛油 1.0g 溶于 100mL 正己烷中配制为 10mg/mL 溶液。所有需要 HPLC 分析的样品及溶剂均经 0.45 μ m 过滤膜过滤处理。

[0049] 3 自由基溶液配制: 同实施例一。

[0050] 4 HPLC 分析方法

[0051] 洗脱剂 A: 正己烷; 洗脱剂 B: 叔丁基甲醚。流速 1.2mL/min。样品浓度 10mg/mL, 进样量 20 μ L。检测波长 280nm。梯度洗脱程序为 0-15min, B: 0% -5%; 15-20min, B: 5% -10%; 20-30min, B: 10% -25%; 30-32min, B: 25% -0%; 32-45min, B: 0%。

[0052] 4 在线系统参数设定

[0053] HPLC 流速 1.2mL/min, 检测波长 280nm。自由基检测波长 425nm。自由基浓度 0.002mmol/L, 自由基溶液流速 1.2mL/min, 反应圈长度 30.0m。

[0054] 5 检测结果

[0055] 对比试验得到的两张色谱图色谱峰与负峰保留时间可知, 牛油含有 1 种抗氧化物质。经过与合成抗氧化剂保留时间对比, 分析出样品牛油中抗氧化物质为特丁基对苯二酚, 其保留时间为 12.46min。

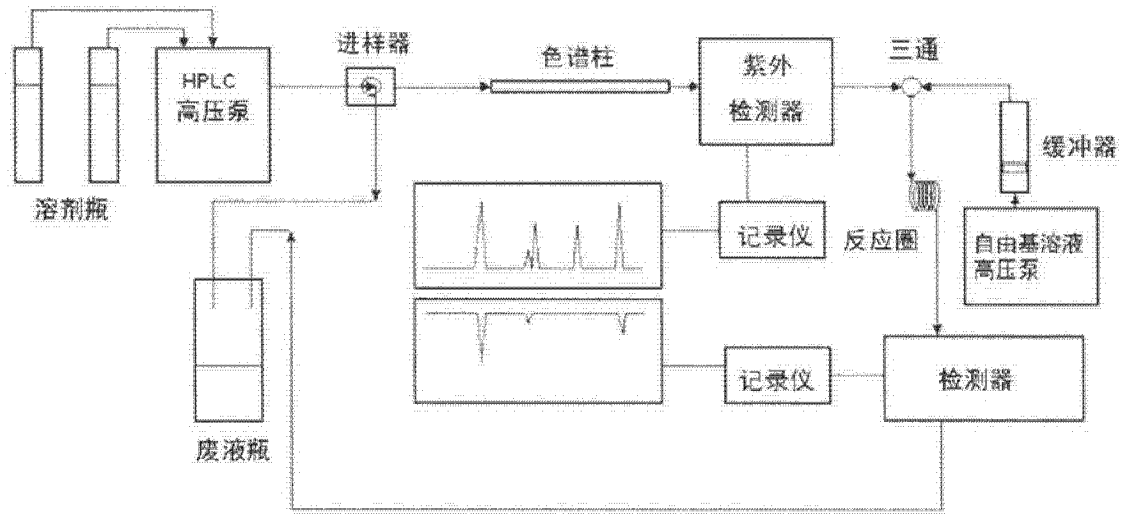


图 1